

## EVALUASI KUALITAS SEMEN BEKU BABI LANDRACE DALAM PENGECER SPERMAX MODIFIKASI DENGAN WAKTU PRE-FREEZING YANG BERBEDA

*(Assessment of Landrace Boar Frozen Semen Quality in Modified Spermax Diluent Under Varying Pre-freezing Durations)*

**Mariana B. Inna Kii\***, Thomas Mata Hine, Yustiany Yuliana Bette, W. Marlene Nalley  
Fakultas Peternakan, Kelautan, dan Perikanan Universitas Nusa Cendana  
Jln. Adisucipto Penfui, Kupang 85001

\*Correspondent author, email: [mirainna33@gmail.com](mailto:mirainna33@gmail.com)

### ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk melihat dampak perbedaan durasi waktu *pre-freezing* (WP) menggunakan pengencer spermax modifikasi (SM) terhadap kualitas semen beku Babi Landrace. Materi penelitian yang digunakan adalah semen segar dari empat ekor babi jantan Landrace sehat yang berusia 2-3 tahun. Semen segar yang memenuhi standar SNI diencerkan dalam pengencer SM dan disimpan pada suhu ruang (27-28°C) untuk *holding time* selama dua jam. Kemudian, semen disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit, supernatan dipisahkan, dan endapan spermatozoa diencerkan kembali dengan pengencer SM dengan perbandingan 1:1. Semen dikemas menggunakan *straw* 0.5 mL, dilanjutkan dengan *packing*, diletakkan di rak pembekuan, dan didiamkan selama dua jam pada suhu 3-5°C untuk proses ekuilibrasi. Setelah melewati tahap ekuilibrasi, semen dievaluasi kembali, lalu *straw* dibekukan di atas permukaan nitrogen cair pada suhu -110°C dengan variasi waktu *pre-freezing* 5, 8, 11, dan 14 menit. Setelah waktu *pre-freezing*, *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair untuk dibekukan dan selanjutnya disimpan dalam kontainer nitrogen cair untuk penyimpanan pada suhu -196°C. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa lamanya waktu *pre-freezing* tidak menyebabkan perbedaan yang signifikan secara statistik ( $P>0,05$ ) dalam nilai motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan *recovery rate* (RR) spermatozoa. Kesimpulannya, waktu *pre-freezing* antara waktu 5 sampai dengan 14 menit memberikan dampak yang serupa terhadap kualitas semen beku Babi Landrace.

**Kata-kata kunci:** gliserol, kuning telur, semen Babi Landrace, spermax, waktu pre freezing

### ABSTRACT

Research was conducted to investigate the impact of different pre-freezing durations (PF) using a modified spermax (M) extender on the quality of frozen landrace boar semen. The study utilized fresh semen from four healthy Landrace boars aged 2-3 years. Fresh semen meeting SNI standards was diluted in SM extender and held at room temperature (27-28°C) for two hours. Subsequently, the semen was centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded, and the sperm pellet was re-diluted with SM extender at a 1:1 ratio. The semen was then packaged in 0.5 mL straws, placed on a freezing rack, and allowed to equilibrate for two hours at 3-5°C. Following equilibration, the semen was re-evaluated, and the straws were frozen above liquid nitrogen at -110°C with varying pre-freezing times of 5, 8, 11, and 14 minutes. After the pre-freezing period, the straws were plunged into liquid nitrogen for final freezing and then stored in liquid nitrogen containers at -196°C. The results indicated that the duration of pre-freezing time did not lead to statistically significant differences ( $P>0,05$ ) in sperm motility, viability, abnormality, and recovery rate (RR). In conclusion, pre-freezing times ranging from 5 to 14 minutes had a similar impact on the quality of frozen landrace boar semen.

**Keywords:** glycerol, egg yolk, landrace boar semen, spermax, pre-freezing time

## PENDAHULUAN

Salah satu teknologi reproduksi yang berkembang pesat dalam upaya mengoptimalkan pemanfaatan pejantan unggul adalah teknologi kriopreservasi semen babi. Salah satu kendala utama dalam pembekuan semen babi adalah penurunan kualitas spermatozoa setelah proses pembekuan. Spermatozoa babi sangat rentan terhadap perubahan suhu drastis atau *cold shock* ketika terpapar suhu rendah, integritas membran sel spermatozoa terancam, dan banyak spermatozoa yang akhirnya mati (Mega *et al.*, 2022). Struktur membran plasma pada spermatozoa babi memiliki karakteristik yang berbeda dari spesies ternak lain. Konsentrasi *phosphatidylethanolamine* (24%) dan *sphingomyelin* (14%) sangat tinggi pada babi, dibandingkan dengan sapi. Spermatozoa babi memiliki kerentanannya terhadap kejutan dingin selama proses pembekuan dan penyimpanan beku, atau relatif lebih baik tahan terhadap efek pembekuan dibandingkan dengan spermatozoa ternak ruminansia (Foeh *et al.*, 2016). Oleh karena itu pengencer yang dipakai dalam pembekuan semen harus mampu memenuhi kebutuhan fisik dan kimia spermatozoa agar kualitasnya tetap terjaga selama proses pendinginan, pembekuan, hingga *thawing* (Yusuf *et al.*, 2017).

Dalam praktik preservasi semen babi, spermax merupakan salah satu produk pengencer komersial yang umum dimanfaatkan, karena mengandung substrat energi bagi spermatozoa seperti glukosa dan natrium bikarbonat yang berfungsi sebagai buffer, bahan ini menjaga pH pengencer agar sesuai dengan kebutuhan spermatozoa (Ngongo *et al.*, 2024). Sejumlah penelitian terdahulu menunjukkan bahwa penambahan kuning telur ke pengencer spermax bisa meningkatkan kualitas semen cair Babi Landrace (Muhammad *et al.*, 2017; Ngongo *et al.*, 2024). Oleh karena itu, dalam penelitian ini spermax disuplementasi dengan kuning telur dalam melindungi spermatozoa agar tidak mengalami kerusakan akibat *cold shock*, hal ini disebabkan karena kandungan *lipoprotein* dan *lesitin* dalam kuning telur. Menurut Anisah *et al.* (2024) didalam kuning telur mengandung protein yang mirip dengan *extracellular superoxide dismutase* dan *plasma glutathione peroxidase*, yang berperan penting dalam meningkatkan kemampuan antioksidan. Lebih lanjut dijelaskan oleh Pandahuki *et al.* (2024) yang menyatakan bahwa antioksidan

berperan penting dalam menetralkan radikal bebas, sehingga mencegah penurunan motilitas sperma selama penyimpanan dengan menghentikan reaksi oksidasi berantai dan melindungi komponen seluler.

Selain bahan pengencer, waktu *pre-freezing* memengaruhi kualitas semen beku babi. *Pre-freezing* adalah tahapan pembekuan semen pada suhu spesifik hingga suhu yang diinginkan tercapai. Lama waktu *pre-freezing* dapat memengaruhi motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa setelah pembekuan (Rangkuti *et al.*, 2021).

*Pre freezing* juga dapat memengaruhi spermatozoa saat pembekuan, karena spermatozoa akan mengalami *cold shock* dan perubahan intraseluler akibat pembentukan kristal es. Menurut Malik *et al.* (2018) semen akan mengalami penurunan kualitas sekitar 10-40% pada saat pembekuan. Oleh sebab itu, perlu ditambahkan bahan yang berfungsi melindungi spermatozoa selama proses pembekuan. Gliserol adalah krioprotektan intraseluler karena dapat masuk ke dalam spermatozoa untuk molekul air bebas sehingga menghambat pembentukan kristal es (Koelima *et al.*, 2022). Penggunaan gliserol dalam pengencer memberikan perlindungan bagi spermatozoa terhadap efek merusak yang mungkin timbul selama pembekuan. Gliserol tidak hanya dapat menembus sel spermatozoa dan menghasilkan energi serta fruktosa, tetapi juga mengubah struktur dengan maksud untuk mengurangi pembentukan kristal es selama proses pembekuan sehingga meminimalkan kerusakan pada spermatozoa.

Menurut Pratiwi *et al.* (2014), waktu *pre freezing* yang optimal untuk spermatozoa sapi simmental adalah 9 menit dengan menggunakan pengencer andromed sedangkan pada spermatozoa sapi limousin yakni 9 menit (Aini *et al.* 2014). Pada spermatozoa babi waktu *pre freezing* yang optimal adalah 20 menit dengan menggunakan pengencer komersial yang disuplementasi dengan trehalosa (Yusuf *et al.* 2017) , sedangkan pada penelitian (Marlize *et al.*, 2021; Mega *et al.*, 2022) adalah 10 menit dengan menggunakan pengencer durasperm modifikasi dengan air buah lontar. Hal ini mengindikasikan bahwa waktu *pre freezing* sangat tergantung pada spesies ternak dan pengencer yang digunakan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi

pengaruh variasi waktu *pre freezing* dalam pengencer spermax modifikasi terhadap kualitas

semen beku Babi Landrace.

## METODE PENELITIAN

### Materi Penelitian

Penelitian menggunakan semen segar babi yang dikumpulkan dari 4 ekor babi jantan landrace yang sehat dengan kisaran usia antara 2-3 tahun, serta sudah terbiasa dengan prosedur penampungan semen. Jenis pakan yang diberikan adalah pakan cap 555 (16% protein dengan pemberian per berat badan 3%) sedangkan untuk air minum adlibitum menggunakan nipple.

### Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap, terdiri atas empat perlakuan dengan durasi waktu yaitu: P<sub>1</sub>= *pre freezing* 5 menit, P<sub>2</sub>= *pre freezing* 8 menit, P<sub>3</sub>= *pre freezing* 11 menit, P<sub>4</sub>= *pre freezing* 14 menit dan empat ulangan.

### Persiapan Pengencer Semen

Dalam proses penyiapan kuning telur, langkah pertama adalah cangkang telur dibersihkan dengan menggunakan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 70% kemudian dikeringkan menggunakan kapas bersih hingga benar-benar kering. Cangkang telur dipecahkan pada bagian yang paling runcing, seluruh putih telur dikeluarkan terlebih dahulu, lalu dipisahkan dari kuning telur. Kuning telur yang masih utuh dengan membran vitelinya diletakkan di atas kertas saring dan kemudian digulingkan secara perlahan hingga seluruh putih telur terserap sempurna menggunakan kertas saring. Sementara itu, selaput vitelin pada kuning telur dipecahkan menggunakan pipet, selanjutnya kuning telur dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditutup rapat menggunakan aluminium foil dan selanjutnya siap untuk digunakan.

Penyiapan pengencer spermax: spermax ditimbang sebanyak 25 gram, dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquabides sebanyak 250 mL kemudian, homogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dengan bantuan *spin bar*. Larutan spermax diambil sebanyak 90 mL kemudian ditambahkan kuning telur 10% dan gliserol 6% kemudian dihomogenkan. Setelah dihomogenkan masukkan ke dalam tabung perlakuan yang

sudah disiapkan sebanyak 7 mL dan pengencer siap untuk digunakan.

### Penampungan Semen

Sumber semen berasal dari 4 ekor Babi Landrace berusia 2-3 tahun. Semen dari babi dikoleksi dengan teknik pemijatan yang dibantu oleh adanya betina buatan (*dummy*). Semen hasil penampungan kemudian segera dibawa ke laboratorium dengan kondisi terlindung dari sinar matahari langsung.

### Evaluasi Semen

Evaluasi kualitas semen setelah ejakulasi dilakukan melalui dua metode secara makroskopis, meliputi evaluasi volume, warna, kekentalan, dan pH; serta secara mikroskopis, yang mencakup perhitungan konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa.

### Pengenceran, Pra Pembekuan, dan Pembekuan Semen

Semen hasil koleksi dibagi dan dimasukkan ke dalam satu tabung perlakuan yang sudah berisi pengencer spermax modifikasi (SM) dengan perbandingan 7:7. Setelah diencerkan, semen disimpan pada suhu ruangan (27-28°C) selama dua jam bagi *holding time*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 2000 RPM selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dipisahkan dan dibuang, selanjutnya endapan diencerkan menggunakan pengencer SM dengan perbandingan 1:1. Setelah pengenceran, semen dikemas ke dalam *straw* yang berukuran 0.5 mL, lalu dilakukan *packing*, *straw* berisi semen disusun di rak pembekuan dan didiamkan selama dua jam pada suhu 3-5°C untuk proses ekuilibrase. Kemudian, dilakukan *pra-pembekuan* dengan cara meletakkan *straw* di atas permukaan N<sub>2</sub> cair yang berjarak 10 cm dengan waktu *pre freezing* selama 5, 8, 11, dan 14 menit. *straw-straw* yang sudah beku dimasukkan dalam goblet dan selanjutnya dimasukkan dalam canister. Setelah itu, dilakukan penyimpanan di dalam kontainer yang mempertahankan suhu -196°C menggunakan nitrogen cair.

## Evaluasi Pasca Pembekuan Semen

Evaluasi terhadap kualitas semen beku dilakukan setelah 24 jam penyimpanan. Proses ini melibatkan pencairan kembali *straw* menggunakan *waterbath* yang berisi air dengan 37°C selama 30 detik, diikuti dengan evaluasi mikroskop untuk mengukur nilai motilitas, viabilitas, dan tingkat abnormalitas spermatozoa.

### Variabel Penelitian

Penelitian ini mengamati beberapa parameter adalah:

1. Motilitas, yaitu kemampuan spermatozoa untuk bergerak maju secara individual, dinilai secara subjektif sesaat setelah proses penampungan semen, dengan meneteskan satu tetes semen pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* kemudian diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10×40. Penilaian dilakukan secara subjektif pada sepuluh lapang pandang yang berbeda, dengan rentang nilai dari 0% hingga 100% dengan skala 5%.
2. Viabilitas dalam evaluasi semen bertujuan untuk mengidentifikasi jumlah spermatozoa yang masih hidup, diamati dengan memanfaatkan preparat ulas yang dibuat melalui pencampuran semen dengan larutan eosin 2%, selanjutnya diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10×40. Penentuan nilai viabilitas spermatozoa menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa yang Hidup}}{\text{Total Spermatozoa yang Terhitung}} \times 100\%$$

3. Abnormalitas merupakan persentase spermatozoa yang menunjukkan ketidaksesuaian bentuk dibandingkan dengan spermatozoa yang normal (Adu et al., 2024). Penilaian abnormalitas spermatozoa dilakukan menggunakan preparat ulas yang dibuat seperti metode penilaian viabilitas. Rumus perhitungan abnormalitas adalah:

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa yang Abnormal}}{\text{Total Spermatozoa yang Terhitung}} \times 100\%$$

4. *Recovery rate* mengukur kemampuan spermatozoa untuk mempertahankan motilitasnya setelah proses pembekuan, yang dihitung dengan membandingkan nilai motilitas setelah pencairan (pasca *thawing*) dengan nilai motilitas semen segar. Rumus perhitungan *recovery rate* adalah:

$$\text{Recovery Rate (\%)} = \frac{\text{Nilai Motilitas Pasca Thawing}}{\text{Nilai Motilitas Semen Segar}} \times 100\%$$

### Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji *Analysis of Variance* (Anova) serta dilanjutkan dengan uji Duncan, dengan bantuan *software* SSPS 25 for *windows*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar

Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan volume semen segar yang diperoleh sebanyak 118,75±38,08 mL. Hasil dari penelitian ini sedikit lebih tinggi dari hasil yang dilakukan oleh Mega (2022) yang menghasilkan volume semen 109,5±2,52 mL dan juga penelitian Banamtuan et al. (2021) melaporkan volume semen 101,75±20,46 mL. Perbedaan rata-rata volume semen dari berbagai penelitian mungkin disebabkan oleh karena jenis ternak, usia, berat badan, frekuensi pengambilan semen, lingkungan, dan metode koleksi semen (Mega et al., 2022). Konsistensi encer serta warna semen yang khas yaitu putih susu, dan pH yang diperoleh pada penelitian ini adalah 6,55±0,17. Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Mega et al. (2022) memperoleh nilai pH sebesar 6,63±0,15.

Secara mikroskopis, persentase motilitas 80,00±0,00%. Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Mere et al. (2019) yang memperoleh motilitas 85±0,00%. Faktor-faktor yang memengaruhi motilitas spermatozoa adalah bangsa, individu, umur ternak, frekuensi ejakulat, dan perubahan temperatur (Dongkot et al., 2022). Nilai viabilitas dari penelitian ini sebesar 94,71±4,62%, hasil penelitian ini lebih tinggi dari Mega et al. (2022) yakni 85,82±4,45%. Berbagai faktor yang memengaruhi persentase viabilitas spermatozoa adalah konsentrasi, motilitas, dan nilai pH.

Hasil penelitian ini menunjukkan persentase abnormalitas 6,15±1,38%. Penelitian ini lebih rendah dari Mere et al. (2019) yakni 12,67±2,90%. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Mato et al. (2024) yakni persentase abnormalitas spermatozoa babi per ejakulasi tidak boleh lebih dari 20%. Nilai konsentrasi

dari penelitian ini sebesar  $276,00 \pm 131,49 \times 10^6/\text{mL}$  hasil penelitian ini tidak

berbeda jauh dari Mere *et al.* (2019) sebesar  $266,67 \pm 13,33 \times 10^6/\text{mL}$ .

Tabel 1. Karakteristik Semen Segar

Karakteristik Semen	Rata-Rata ± Standar Deviasi
<b>Makroskopis</b>	
Volume Semen (mL)	118,75±38,08
Warna	Putih Susu
pH	6,55±0,17
Konsistensi	Encer
<b>Mikroskopis</b>	
Motilitas (%)	80,00±0,00
Viabilitas (%)	94,71±4,62
Abnormalitas (%)	6,15±1,38
Konsentrasi $\times 10^6$ Sel Sperma/ mL)	276,00±131,49

Sumber: Diolah dari data primer.

Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan volume semen segar yang diperoleh sebanyak  $118,75 \pm 38,08$  mL (Tabel 1). Hasil dari penelitian ini sedikit lebih tinggi dari hasil yang dilakukan oleh Mega (2022) yang menghasilkan volume semen  $109,5 \pm 2,52$  mL dan juga penelitian Banamtuan *et al.* (2021) melaporkan volume semen  $101,75 \pm 20,46$  mL. Perbedaan rata-rata volume semen dari berbagai penelitian mungkin disebabkan oleh karena jenis ternak, usia, berat badan, frekuensi pengambilan semen, lingkungan, dan metode koleksi semen (Mega *et al.*, 2022). Konsistensi encer serta warna semen yang khas yaitu putih susu, dan pH yang diperoleh pada penelitian ini adalah  $6,55 \pm 0,17$ . Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Mega *et al.* (2022) memperoleh nilai pH sebesar  $6,63 \pm 0,15$ .

Secara mikroskopis, persentase motilitas  $80,00 \pm 0,00\%$ . Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Mere *et al.* (2019) yang memperoleh motilitas  $85 \pm 0,00\%$ . Faktor-faktor yang memengaruhi motilitas spermatozoa adalah bangsa, individu, umur ternak, frekuensi ejakulat, dan perubahan temperatur (Dongkot *et al.*, 2022). Nilai viabilitas dari penelitian ini sebesar  $94,71 \pm 4,62\%$ , hasil penelitian ini lebih tinggi dari Mega *et al.* (2022) yakni  $85,82 \pm 4,45\%$ . Berbagai faktor yang memengaruhi persentase viabilitas spermatozoa adalah konsentrasi, motilitas, dan nilai pH.

Hasil penelitian ini menunjukkan persentase abnormalitas  $6,15 \pm 1,38\%$ . Penelitian ini lebih rendah dari Mere *et al.* (2019) yakni  $12,67 \pm 2,90\%$ . Hasil ini sesuai dengan pernyataan Mato *et al.* (2024) yakni persentase abnormalitas spermatozoa babi per ejakulasi tidak boleh lebih dari 20%. Nilai konsentrasi dari penelitian ini sebesar

$276,00 \pm 131,49 \times 10^6/\text{mL}$  hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dari Mere *et al.* (2019) sebesar  $266,67 \pm 13,33 \times 10^6/\text{mL}$ .

### Pengaruh Waktu *Pre Freezing* Terhadap Motilitas Spermatozoa

Kemampuan spermatozoa untuk bergerak maju secara progresif (motilitas) memainkan peran krusial dalam keberhasilan pembuahan. Menurut Mukminat dan Suharyati (2014), spermatozoa harus memiliki kemampuan bergerak maju agar dapat melakukan perjalanan melalui saluran reproduksi betina dan berhasil membuahi ovum. Spermatozoa yang memiliki kemampuan bergerak aktif merupakan indikator penting dalam menentukan kualitas spermatozoa dalam kaitannya terhadap tingkat fertilitas (Ndeta *et al.*, 2015). Standar Nasional Indonesia (SNI, 2024) menetapkan bahwa motilitas spermatozoa setelah *thawing* minimal 30% agar layak digunakan untuk inseminasi. Rerata nilai motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan *recovery rate* spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil analisis pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa durasi waktu *pre-freezing* tidak memberikan pengaruh yang signifikan secara statistik ( $P > 0,05$ ) terhadap kualitas spermatozoa Babi Landrace setelah proses *thawing*. Hal ini berarti bahwa durasi waktu *pre-freezing* spermatozoa selama 5 hingga 14 menit dalam pengencer spermax modifikasi memberikan dampak yang relatif sama terhadap motilitas spermatozoa pasca *thawing*.

Berdasarkan analisis statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) antar perlakuan, meskipun  $P_4$  menunjukkan angka motilitas yang lebih tinggi, yaitu  $38,75\%$  dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini diduga disebabkan oleh tingginya tingkat

kematian spermatozoa dengan waktu adaptasi suhu yang lebih singkat. Rangkuti *et al.* (2021) menyampaikan bahwa waktu adaptasi yang tidak cukup bagi spermatozoa terhadap suhu dingin sebelum pembekuan dalam nitrogen cair (-196°C) mengakibatkan kerusakan signifikan. Hal ini disebabkan oleh *cold shock* dan perubahan di dalam sel yang berhubungan dengan pembentukan kristal es. Sebaliknya, *pre-freezing* selama 14 menit memberikan waktu yang lebih memadai bagi spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan penurunan suhu sehingga dapat mengurangi kerusakan tersebut.

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mega (2022) dengan nilai motilitas 28,13% pasca *thawing* pada semen Babi Landrace yang diencerkan dengan durasperm modifikasi air buah lontar. Yusuf *et*

*al.* (2017) melaporkan nilai motilitas 30,00% pada spermatozoa Babi Landrace dan Duroc menggunakan pengencer BTS dengan penambahan trehalosa. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ketika ditambahkan gliserol 6% memberikan respon yang baik terhadap semua perlakuan. Fafo *et al.* (2016) mengatakan bahwa kejutan dingin terhadap sel spermatozoa juga menurunkan motilitas dan daya tahan hidupnya sehingga terjadi perubahan permeabilitas dan komponen lipid pada membran spermatozoa. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu *pre freezing* selama 5 hingga 14 menit secara teknik layak digunakan untuk inseminasi sesuai (SNI 2024) dengan standar minimal motilitas spermatozoa pasca *thawing* untuk semen beku babi sebesar 30%.

Tabel 2. Rerata nilai motilitas, viabilitas, abnormalitas, *recovery rate* spermatozoa pada waktu *pre freezing* (%).

Perlakuan	Pasca <i>Thawing</i>			
	Motilitas	Viabilitas	Abnormalitas	<i>Recovery Rate</i>
P <sub>1</sub>	33,12±6,88 <sup>a</sup>	55,71±14,01 <sup>a</sup>	6,90±0,92 <sup>a</sup>	41,21 <sup>a</sup>
P <sub>2</sub>	37,50±5,40 <sup>a</sup>	58,59±12,28 <sup>a</sup>	6,64±1,26 <sup>a</sup>	46,74 <sup>a</sup>
P <sub>3</sub>	35,62±6,25 <sup>a</sup>	57,60±12,23 <sup>a</sup>	7,39±1,32 <sup>a</sup>	44,34 <sup>a</sup>
P <sub>4</sub>	38,75±7,77 <sup>a</sup>	68,44±16,56 <sup>a</sup>	7,78±1,10 <sup>a</sup>	48,37 <sup>a</sup>
P. Value	0,66	0,58	0,53	0,65

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom menunjukkan perbedaan tidak nyata ( $P>0,05$ ), P<sub>1</sub>: 5 menit, P<sub>2</sub>: 8 menit, P<sub>3</sub>: 11 menit, P<sub>4</sub>: 14 menit.

Hasil analisis pada Tabel 2 memperlihatkan bahwa durasi waktu *pre-freezing* tidak memberikan pengaruh yang signifikan secara statistik ( $P>0,05$ ) terhadap kualitas spermatozoa Babi Landrace setelah proses *thawing*. Hal ini berarti bahwa durasi waktu *pre freezing* spermatozoa selama 5 hingga 14 menit dalam pengencer spermax modifikasi memberikan dampak yang relatif sama terhadap motilitas spermatozoa pasca *thawing*.

Berdasarkan analisis statistik, tidak terdapat perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) antar perlakuan, meskipun P<sub>4</sub> menunjukkan angka motilitas yang lebih tinggi, yaitu 38,75% dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini diduga disebabkan oleh tingginya tingkat kematian spermatozoa dengan waktu adaptasi suhu yang lebih singkat. Rangkuti *et al.* (2021) menyampaikan bahwa waktu adaptasi yang tidak cukup bagi spermatozoa terhadap suhu dingin sebelum pembekuan dalam nitrogen cair (-196°C) mengakibatkan kerusakan signifikan. Hal ini disebabkan oleh *cold shock* dan

perubahan di dalam sel yang berhubungan dengan pembentukan kristal es. Sebaliknya, *pre-freezing* selama 14 menit memberikan waktu yang lebih memadai bagi spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan penurunan suhu sehingga dapat mengurangi kerusakan tersebut.

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini lebih besar dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mega (2022) dengan nilai motilitas 28,13% pasca *thawing* pada semen Babi Landrace yang diencerkan dengan durasperm modifikasi air buah lontar. Yusuf *et al.* (2017) melaporkan nilai motilitas 30,00% pada spermatozoa Babi Landrace dan Duroc menggunakan pengencer BTS dengan penambahan trehalosa. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa ketika ditambahkan gliserol 6% memberikan respon yang baik terhadap semua perlakuan. Fafo *et al.* (2016) mengatakan bahwa kejutan dingin terhadap sel spermatozoa juga menurunkan motilitas dan daya tahan hidupnya sehingga terjadi perubahan permeabilitas dan komponen lipid pada

membran spermatozoa. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu *pre freezing* selama 5 hingga 14 menit secara teknik layak digunakan untuk inseminasi sesuai (SNI 2024) dengan standar minimal motilitas spermatozoa pasca *thawing* untuk semen beku babi sebesar 30%.

### **Pengaruh Waktu *Pre Freezing* Terhadap Viabilitas Spermatozoa**

Barek *et al.* (2020) menyampaikan bahwa viabilitas yang lebih tinggi mengindikasikan kualitas semen yang lebih baik. Viabilitas spermatozoa dinilai objektif dengan pewarnaan diferensial. Spermatozoa hidup ditandai dengan kepala spermatozoa yang transparan karena tidak menyerap warna eosin karena membran selnya yang utuh mampu mencegah masuknya pewarna eosin, sementara spermatozoa mati akan berwarna merah karena membran selnya yang rusak memungkinkan pewarna eosin menembus masuk. Kondisi membran spermatozoa yang masih berfungsi dengan baik menjadi alasan mengapa sel spermatozoa yang hidup tidak menyerap pewarna, sehingga persentase viabilitas yang tinggi dapat teramati. Integritas membran sel spermatozoa yang utuh dan berfungsi efektif menghalangi penetrasi pewarna ke dalam sel (Pratama *et al.*, 2018). Rerata nilai viabilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil analisis pada Tabel 2 terhadap viabilitas spermatozoa menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata secara statistik ( $P>0,05$ ) di antara semua kelompok perlakuan. Akan tetapi, perlakuan  $P_4$  dengan durasi *pre-freezing* 14 menit menghasilkan nilai viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan  $P_1$ ,  $P_2$ , dan  $P_3$ . Berkurangnya jumlah spermatozoa yang hidup setelah proses *pre-freezing* terjadi akibat *cold shock* dan kerusakan pada membran sel yang disebabkan oleh pembentukan kristal es. Proses pembentukan kristal es ini mengakibatkan perbedaan konsentrasi zat terlarut antara bagian dalam dan luar sel, yang meningkatkan tingkat kematian spermatozoa. Pratiwi *et al.* (2014) menyatakan bahwa peningkatan tekanan osmotik dalam plasma semen dapat mengurangi permeabilitas membran spermatozoa dan memperparah kerusakan membran, yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel spermatozoa.

Nilai viabilitas tertinggi setelah pasca *thawing* pada penelitian ini terlihat pada  $P_4$  dengan nilai 68,44% selama 14 menit waktu *pre*

*freezing* dan nilai viabilitas paling rendah terdapat pada  $P_1$  dengan nilai 55,71% selama 5 menit *pre freezing*. Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini lebih besar daripada hasil dari penelitian yang telah dilakukan Mega *et al.* (2022) dengan viabilitas spermatozoa Babi Landrace hanya 49,53% yang menggunakan pengencer durasperm modifikasi air buah lontar, serta Marlize *et al.* (2021) menunjukkan viabilitas spermatozoa Babi Landrace 58,21% yang menggunakan pengencer durasperm termodifikasi. Meskipun demikian, hasil penelitian ini lebih rendah dari penelitian yang telah dilakukan Yusuf *et al.* (2017) yang menunjukkan viabilitas spermatozoa berkisar antara 68,20% sampai dengan 70,80% pada semen beku Babi Landrace dan Duroc dalam pengencer BTS yang diperkaya dengan trehalosa. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh penetrasi gliserol yang lebih sempurna ke dalam sel spermatozoa dalam penelitian ini, sehingga tercapai keseimbangan konsentrasi elektrolit antara intraseluler dan ekstraseluler, dan juga spermatozoa dapat memanfaatkan sumber energi secara optimal (Mega *et al.*, 2022).

Menurut Mega *et al.* (2022), waktu ekuilibrisasi yang terkontrol selama kriopreservasi semen bertujuan untuk memberikan kesempatan bagi gliserol untuk masuk ke dalam sel spermatozoa dan mengikat sebagian air bebas di dalamnya, yang bertujuan untuk menghambat terjadinya pembentukan kristal es di dalam cairan pengencer selama berlangsungnya tahapan pembekuan dan mencegah kehilangan air berlebihan pada spermatozoa.

### **Pengaruh Waktu *Pre Freezing* Terhadap Abnormalitas Spermatozoa**

Penentuan kualitas spermatozoa mempertimbangkan abnormalitas sebagai salah satu indikatornya, karena struktur sel yang tidak normal dapat mengganggu dan menghambat proses pembuahan (Bria *et al.*, 2022). Pernyataan ini selaras dengan pendapat Banamtuan *et al.* (2021) yang menjelaskan bahwa ketidaknormalan spermatozoa berdampak pada kualitas spermatozoa untuk inseminasi dan pada akhirnya dapat menurunkan tingkat keberhasilan IB. Rerata nilai abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan analisis yang tertera pada Tabel 2, dapat diamati bahwa waktu *pre-freezing* tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan secara statistik ( $P>0,05$ ) terhadap tingkat abnormalitas spermatozoa setelah proses

*thawing* (pencairan). Hal ini mengindikasikan bahwa durasi waktu *pre-freezing* selama 5, 8, 11, dan 14 menit dalam pengencer spermax modifikasi memberikan daya protektif terhadap abnormalitas spermatozoa pasca *thawing* dengan nilai abnormalitas berkisar antara 6,90-7,78%. Bentuk abnormalitas yang diamati selama penelitian kebanyakan abnormalitas sekunder seperti ekor putus, atau kepala tanpa ekor. Hal ini mungkin diakibatkan karena tekanan dan gesekan ketika melakukan pembuatan preparat ulas. Pernyataan ini sesuai dengan Yekti *et al.* (2023) yang menyatakan perlakuan saat menyiapkan preparat ulas menjadi penyebab timbulnya abnormalitas sekunder.

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini lebih besar daripada hasil dari penelitian yang dilakukan Marlize *et al.* (2021) yang menunjukkan nilai abnormalitas 6,72% pada semen beku Babi Landrace menggunakan pengencer duraspern termodifikasi dan Mega *et al.* (2022) dengan nilai abnormalitas 6,26% menggunakan pengencer duraspern modifikasi dengan air buah lontar pada pembekuan semen Babi Landrace. Walaupun demikian, nilai abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini jika persentase abnormalitas tidak melebihi 20%, semen dianggap memenuhi syarat untuk digunakan dalam inseminasi buatan.

Diduga, hasil ini disebabkan oleh kemampuan spermatozoa untuk beradaptasi secara optimal menggunakan pengencer dan krioprotektan. Adaptasi ini menghasilkan keseimbangan konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel, yang berfungsi menjaga tekanan osmotik sel selama kriopreservasi. Dengan demikian, tindakan pencegahan dapat dilakukan untuk menghindari kerusakan pada selubung lipoprotein dan membran sel. Hal ini sejalan dengan pandangan Mega *et al.* (2022) yang menjelaskan bahwa keseimbangan kadar cairan di luar dan di dalam sel memegang peranan penting dalam menjaga tekanan osmotik sel, sehingga kerusakan pada lapisan lipoprotein dan membran sel selama pembekuan dapat dicegah. Kondisi inilah yang berkontribusi pada rendahnya tingkat abnormalitas spermatozoa setelah proses *thawing*. Hasil yang diperoleh pada penelitian mengindikasikan bahwa penambahan gliserol pada setiap perlakuan memberikan perlindungan yang cukup besar terhadap abnormalitas spermatozoa selama proses pembekuan sehingga masih layak secara teknis untuk inseminasi.

### **Recovery Rate Spermatozoa**

*Recovery Rate (RR)* merupakan sebuah indikator yang menunjukkan seberapa baik spermatozoa mampu memulihkan kemampuan pergerakannya setelah proses pembekuan dan pencairan (*thawing*). Nilai RR diperoleh dengan cara membandingkan persentase spermatozoa yang bergerak aktif setelah proses *thawing* dengan persentase motilitas spermatozoa pada sampel semen segar sebelum pembekuan (Aisah *et al.*, 2017). *Recovery rate* merupakan salah satu nilai yang menunjukkan keberhasilan dalam kriopreservasi semen dan sekaligus menggambarkan efisiensi proses penyimpanan. Nilai rerata RR yang tinggi menandakan bahwa proses pembekuan yang diterapkan berhasil dengan baik. Rerata nilai RR seperti yang tertera pada Tabel 2.

Analisis statistik menunjukkan bahwa variasi waktu *pre-freezing* tidak memberikan perbedaan yang signifikan secara statistik ( $P>0,05$ ) terhadap *Recovery Rate (RR)* spermatozoa, dengan demikian dapat dilihat bahwa keempat perlakuan memberi dampak yang sama terhadap *recovery rate*. Namun pada perlakuan  $P_4$  (*pre freezing* 14 menit) memiliki angka lebih tinggi yaitu 48,37% diikuti oleh  $P_2$  (*pre freezing* 11 menit) yaitu 46,74%,  $P_3$  (*pre freezing* 8 menit) yaitu 44,34% dan nilai RR paling rendah adalah waktu  $P_1$  (*pre freezing* 5 menit) yaitu 41,21%. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini lebih tinggi dari Mega *et al.* (2022) dengan nilai RR 40,18% dan Marlize *et al.* (2021) dengan nilai RR 43,74%. Rendahnya nilai RR pada perlakuan  $P_1$  (*pre freezing* 5 menit) sebesar 41,21%. Diduga, hal ini disebabkan karena spermatozoa belum sepenuhnya beradaptasi dengan pengencer krioprotektan gliserol, sehingga rentan terhadap *cold shock* dan pembentukan kristal es (Koelima *et al.*, 2022). Selain itu, hal ini juga berhubungan dengan tingkat keutuhan membran plasma spermatozoa yang esensial bagi organel sel untuk melakukan metabolisme dalam untuk menghasilkan pergerakan sperma yang optimal. Jika pergerakan menurun, tingkat Pemulihan (RR) juga akan menurun. Hal ini sejalan dengan temuan Sunami *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa tingginya *recovery rate* sangat terkait dengan banyaknya spermatozoa yang menunjukkan pergerakan progresif.

## SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa variasi waktu *pre-freezing* dari 5 sampai 14 tidak menghasilkan efek yang berbeda secara signifikan terhadap kualitas semen beku Babi Landrace.

## SARAN

Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengevaluasi efektivitas inseminasi buatan menggunakan pengencer Spermax dengan variasi waktu *pre-freezing*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adu, A.A., Nalley, W.M., Bette, Y.Y., dan Uly, K. 2024. Perbandingan Kualitas Semen Babi Landrace Dalam Pengencer Beltsville Thawing Solution Dengan Atau Tanpa Plasma Semen Dengan Penambahan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera Lam*). *Jurnal Penelitian Ilmu Humaniora*. 7(6): 105–114.  
<https://humaniora.ojs.co.id/index.php/jpih/article/view/286>
- Aini, K., Suharyati, S., dan Hartono, M. 2014. Pengaruh Jarak Straw Dengan Nitrogen Cair Pada Proses Pre Freezing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(3): 62–70.  
<https://doi.org/10.23960/jipt.v2i3.p%25p>
- Aisah, S., Isnaini, N., dan Wahyuningsih, S. 2017. Kualitas Semen Segar Dan Recovery Rate Sapi Bali Pada Musim Yang Berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 27(1): 63-79.  
<https://Doi.Org/10.21776/Ub.Jiip.2017.02.7.01.06>
- Anisah, A., Riyadhhi, M., dan Rizal, M. 2024. Kualitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Pada Kombinasi Pengencer Tris Dan Beberapa Jenis Kuning Telur. *Jurnal Penelitian Peternakan Lahan Basah*. 4(1): 18-24.  
<https://doi.org/10.20527/jpplb.v4i1.2375>
- Banamantuan, A.N., Nalley, W.M., dan Hine, T.M. 2021. Kualitas Semen Cair Babi Duroc Dalam Pengencer Durasperm yang Disuplementasi Air Buah Lontar dan Sari Tebu. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 16(1): 41-48.  
<https://Doi.Org/10.31186/Jspi.Id.16.1.41-48>
- Barek, M.E., Uly, K., Hine, T.M., & Nalley, W.M., dan Belli, H.L.L. 2020. Pengaruh Penambahan Sari Wortel Dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Bligon. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 7(2): 109-117.  
<https://Doi.Org/10.35508/Nukleus.V7i2.3152>
- Bria, M.M., Nalley, W.M., Kihe, J.N., dan Hine, T.M. 2022. Pengaruh Substitusi Sari Buah Semangka (*Citrullus Lanatus*) Dalam Pengencer Sitrat- Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 23–32.  
<https://Doi.Org/10.35508/Nukleus.V9i1.4393>
- Dongkot, S., Marawali, A., Hine, T.M., dan Nalley, W.M. 2022. Kualitas Semen Beku Babi Duroc dalam Pengencer Tris Modifikasi dengan Waktu Ekuilibrasi yang Berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 72–84.  
<https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.5491>
- Fafo, M., Hine, T.M., dan Nalley, W.M. 2016. Pengujian Efektivitas Ekstrak Daun Kelor Dalam Pengencer Sitrat-Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Babi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 3(2): 184-195.  
<https://doi.org/10.35508/nukleus.v3i2.805>
- Foeh, N.D.F.K., Arifiantini, R.I., dan Yusuf, T.L. 2016. Viabilitas Spermatozoa Semen Beku Babi Duroc Dalam Extender Beltsville Thawing Solution. *Jurnal Kajian Veteriner*. 4(1): 24-32.  
<https://doi.org/10.35508/jkv.v4i1.1013>
- Koelima, B.V., Belli, H.L.L., Kihe, J.N., dan Nalley, W.M. 2022. Pengaruh Lama

- Ekuilibrase Terhadap Kualitas Semen Beku Babi Duroc Dalam Pengencer Tris-Modifikasi Dengan Penambahan Krioprotektan. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 92-100. <https://doi.org/10.35508/Nukleus.V9i1.5490>
- Malik, A., Fauzi, R., Zakir, M.I., dan Sakiman, S. 2018. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol Dalam Pembekuan Pada Kualitas Pasca-Thawing Spermatozoa Sapi Bali. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 5(2): 98-104. <https://doi.org/10.29244/Avi.5.2.98-104>
- Marlize, S., Hine, T.M., dan Nalley, W.M. 2021. Pengaruh Waktu Ekuilibrase Terhadap Kualitas Semen Beku Babi Landrace Dalam Pengencer Durasperm Termodifikasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 8(2): 150–160. <https://doi.org/10.35508/Nukleus.V8i2.4867>
- Mato, S.I., Nalley, W.M., Hine, T.M., & Marawali, A. 2024. Perbandingan Kualitas Spermatozoa Babi Landrace Dalam Pengencer Dasar Natrium Chloride Fisiologis dengan Level Kuning Telur yang Berbeda. *Comserva: Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*. 4(1): 32-44. <https://doi.org/10.59141/comserva.v4i1.1292>
- Mega, M.G., Nalley, W.M., Marawali, A., dan Belli, H.L.L. 2022. Pengaruh Perbedaan Waktu Ekuilibrase Terhadap Kualitas Semen Beku Babi Landrace Dalam Pengencer Durasperm Modifikasi Dengan Air Buah Lontar. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 57–65. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.4988>
- Mere, C.Y.L., Gaina, C.D., dan Foeh, N.D.F.K. 2019. Air kelapa dan Air Buah Lontar Sebagai Modifikasi Pengencer Alternatif pada Semen Babi Landrace. *Jurnal Veteriner Nusantara*. 2(2): 20-30. <http://ejournal.undana.ac.id/JVN>
- Muhammad, D., Susilawati, T., dan Wahjuningsih, S. 2017. Pengaruh Penggunaan Cep-2 Dengan Suplementasi Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Fh. *TERNAK TROPIKA: Journal of Tropical Animal Production*. 17(1): 66-76. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2016.017.01.8>
- Mukminat, A., dan Suharyati, S. 2014. Pengaruh Penambahan Berbagai Sumber Karbohidrat Pada Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(2): 87–92. <http://jurnal.fp.unila.ac.id/index.php/jip/article/view/492>
- Ndeta, A.K., Belli, H.L.L., dan Uly, K. 2015. Pengaruh Sari Wortel Dengan Tingkat yang Berbeda Pada Pengaruh Sitrat Kuning Telur Terhadap Motilitas, Viabilitas, dan Derajat Keasaman Spermatozoa Babi Landrace. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 2(2): 117–128. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v2i2.764>
- Ngongo, D.B., Hine, T.M., Riwu, A.R., dan Nalley, W.M. 2024. Pengaruh Penggunaan Berbagai Jenis Kuning Telur Dalam Pengencer Spermax Terhadap Kualitas Semen Cair Babi Landrace. *Jurnal Penelitian Ilmu Humaniora*. 7(7): 17–28. <https://humaniora.ojs.co.id/index.php/jpih/article/view/333>
- Rangkuti, N.J., Suteky, T., dan Putranto, H.D. 2021. Pengaruh Waktu Pre Freezing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali di UPTD IB Bengkulu. *Prosiding Seminar Nasional Pembangunan dan Pendidikan Vokasi Pertanian*. 2(1): 165–176. <https://doi.org/10.47687/Snppvp.V2i1.183>
- Pandahuki, F.O., Nalley, W.M., Uly, K., dan Hine, T.M. 2024. Pengaruh Penambahan Ekstrak Biji Kelor Kering (*Moringa Oleifera Lam*) Dalam Pengencer Beltsville Thawing Solution Terhadap Kualitas Semen Cair Babi Landrace. *Animal Agricultura*. 2(1): 488-498. <https://doi.org/10.59891/Animacultura.V2i1.67>
- Pratama, J.W.A., Sari, D.A.K., dan Sigit, M. 2018. Pengaruh Beberapa Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simental. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia*. 3(2): 35–38. <https://erepository.uwks.ac.id/11952/>
- Pratiwi, R.I., Suharyati, S., dan Hartono, M. 2014. Analisis Kualitas Semen Beku Sapi Simmental Menggunakan Pengencer Andromed Dengan Variasi Waktu Pre Freezing. *Jurnal Ilmiah Peternakan*

- Terpadu*. 2(3): 8–15.  
<https://doi.org/10.23960/jipt.v2i3.p%25p>
- Standar Nasional Indonesia. 2024. *Semen Beku – Bagian 4: Babi*.  
<https://nakeswan.bsip.pertanian.go.id/berita/bsn-luncurkan-sni-semen-beku-babi>
- Sunami, S., Isnaini, N., dan Wahjuningsih, S. 2017. Kualitas Semen Segar dan Recovery Rate (Rr) Sapi Limousin Pada Musim yang Berbeda. *Ternak Tropika Journal Of Tropical Animal Production*. 18(1): 36-50.  
<https://Doi.Org/10.21776/Ub.Jtapro.2017.018.01.6>
- Yekti, A.P.A., Setiawan, R.E.R., Rachmawati, A., dan Susilawati, T. 2023. Kualitas Semen Beku Sapi Limousin Setelah Thawing Menggunakan Air Dingin Dengan Lama Waktu yang Berbeda. *Jurnal Agripet*. 23(1): 25-32.  
<https://Doi.Org/10.17969/Agripet.V23i1.23331>
- Yusuf, T., Arifiantini, R., Dapawole, R., dan Nalley, W.M. 2017. Kualitas Semen Beku Babi Dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi Dengan Trehalosa. *Jurnal Veteriner*. 18(1): 69–75.  
<https://Doi.Org/10.19087/Jveteriner.2017.18.1.69>